植 物 分 类 学 报 26 (5): 353—361 (1988)
Acta Phytotaxonomica Sinica

中国柑桔数量化学分类研究*

朱 立 武
(安徽农学院园艺系，合肥)

摘要 本文运用数量分类学的原理和方法，分析了柑桔 83 个生物型叶片可溶性蛋白质电泳谱带的相似性。对属、种内的部分生物型的相似性进行了比较；探讨了金柑属在柑桔分类中的地位；对一些起源不明的生物型的可能祖先作了推断。从叶片蛋白质谱带相似性聚类分析树系图上，可发现柑桔由枳到柑亚类的大致进化趋势；作者认为，将宜昌橙归入大翼橙类要更加合理。

关键词 柑桔；蛋白质；电泳；谱带相似性；聚类分析

一、引 言

自林奈 (Linnaeus 1753) 确立柑桔属 *Citrus* L. 到现在的两百多年中，柑桔分类问题一直争论不休。目前颇有影响的主要是施文格 (Swingle) 的"大种"和田中 (Tanaka) 的"小种"分类系统[1]。还有很多学者提出了自己的见解，对前人的观点进行修改或提出折中看法。如辛夫 (Singh) 认为柑桔属有价值的种只有 31 个，提出了实用的柑桔分类法[14]；曾勉将原柑桔属分为五个新属，24 个主要种[7]，创立了"小属"分类系统，等等。这些分类系统皆建立于传统的形态学基础之上。染色体，蛋白质和核酸等资料的采用，能更直接地反映种类间的亲缘关系[14,15]。我国是柑桔起源中心之一[4]，有关柑桔分类的研究报道文献不少，但涉及生理生化方面的系统研究工作则做得不多。

本文根据柑桔叶片可溶性蛋白质电泳资料分析，试对如下问题进行探讨：(1)比较属、种内不同生物型蛋白质谱带的相似性，研究种间、种内差异。(2)分析未知起源的生物型蛋白质谱带情况；以推断其可能祖先。(3) 试从叶片蛋白质谱带相似性聚类分析的角度，探讨柑桔系统演化趋势，为综合的系统分类分析提供资料。

二、材料与方法

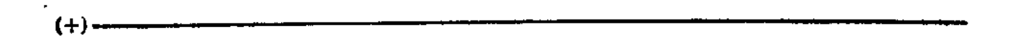
(一) 取材

为确定适当的取样时期，在正式试验前进行了预备实验。实验从 1984 年 9 月开始，至 1985 年 12 月结束。1984 年分析样品 81 个，1985 年进行了部分重复和补充。所有试材皆取自中国农科院柑桔研究所，供试验的 83 个生物型，按施文格分类系统有 11 个种，按田中分类系统有 30 个种，详细情况见附录。

取样时，选择生长正常的植株，在树冠内外各部位取成熟叶片 10—20 片，放入冰瓶中带至室内。

---

* 本文承蒙蒋聪强先生指导，叶荫民、熊继华先生审阅，郭天池、陈全友先生提供试材，蒋康众先生校核样品英文名，在此一并表示感谢！



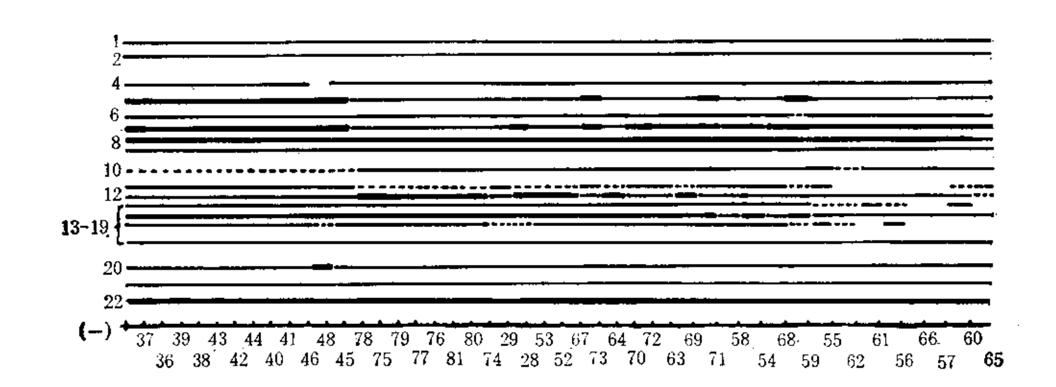


图 1 柑桔叶片可溶性蛋白质聚丙烯

注: 由图中标出的样品号(1—83)

Fig. 1 Patterns of soluble proteins in citrus plant leaves

Note: The name of each sample can be consulted from the appendix

(二)样品制备

1. 清洗: 以自来水洗去叶表面污垢后,用去离子水冲一遍,再以粗滤纸或干净纱布吸去叶表面水分。

2. 提取: 称取鲜叶 1g,破碎后加 Tris-柠檬酸缓冲液 4ml (pH8.2)、石英砂少许,置研钵中于冰浴上充分研磨,匀浆转入离心管内,放在 0—4℃ 冰箱中浸提 5—8 小时。

3. 离心: 盛有样品的离心管从冰箱中取出初步配平后, 立即放入离心机, 以 7500—8000 转/分钟的转速离心 10—20 分钟。 然后取上清液并加入等量的 40% 甘油混合, 即得电泳分析所需的蛋白质溶液。

(三)电泳方法

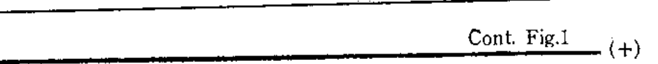
1. 电泳: 采用聚丙烯酰胺不连续凝胶系统,双垂直板电泳;浓缩胶浓度 3.5%,分离胶浓度 10.5%;进样量为 20μl; 按 10V/cm 凝胶进行稳压电泳[3]。

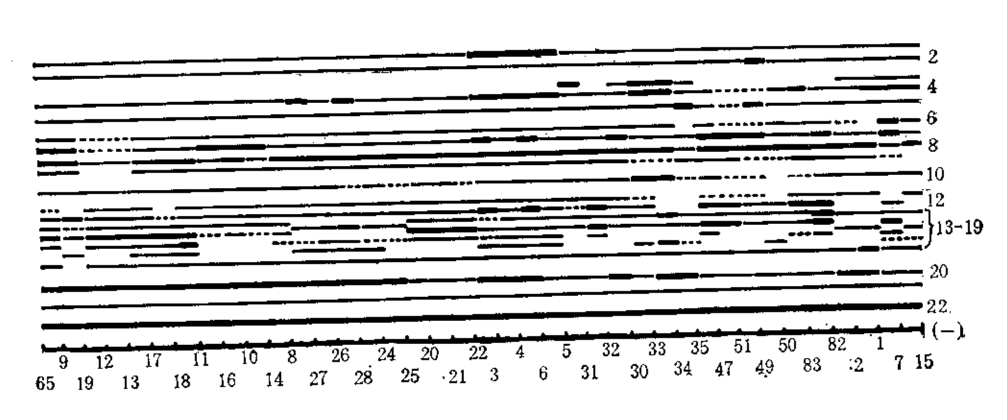
2. 染色: 以 0.1% 考马斯亮兰 (Coomassia brilliant blue G250) 12.5% 三氯乙酸溶液染色,至凝胶背景微微着色为止(温室下约需 5 小时),以自来水浸泡凝胶板,退去背景色。

3. 记录: 每一样品重复电泳 2—3 次, 根据蛋白质谱带迁移率综合绘图, 然后拍照或制成凝胶干板保存。所有样品蛋白质谱带见图 1 。

(四)资料分析

1. 谱带编码: 将所有样品中出现的迁移率不同的蛋白质谱带视为不同的性状, 按迁移率由大到小进行编号。 蛋白质谱带按染色深浅又可分为强、中、弱三等级。编码时, 根据每个样品谱带出现情况予以赋值: 无带,0;有弱带,1;有中带,2;有强带,3。





酰胺凝胶电泳图谱
可于附录中查得样品名。
obtained by acrylamide gel electrophoresis.
according to sample number (1—83) marked in the figure.

所有样品赋值后，列成表格，即构成一个距阵 $X_{t\times n}$ (t 为样品数，n 为蛋白质谱带种类数)，距阵 $X_{t\times n}$ 即是分类运算所需的原始数据距阵[5][6]。

2. 聚类运算：原始数据距阵经标准化后，计算每两样品间的相似性系数，本文采用平均欧氏距离系数，聚类运算应用距离系统聚类的类平均法 (UPGMA)[15]。所用计算机为 Great Wall 0520 型，输出的最终结果是每次聚类样品号和聚类的距离水平。再由输出结果画出聚类分析树系图(图 2)。

三、结果与分析

(一) 属内、种内蛋白质谱带的相似性

1. 属内相似性：根据本试验所取样品分析，金柑属种间相似性距离系数最小，平均欧氏距离为 0.617，说明金柑属种间有较密切的亲缘关系；枳属两生物型之间的平均欧氏距离是 0.927；柑桔属属内差异最大，平均欧氏距离为 2.133，这表明柑桔属的种间相似性较小，基因基础比金柑属、枳属都复杂。

2. 种内差异：按施文格分类系统所定的种，柠檬 *Citrus limon*，葡萄柚 *C. paradisi*，甜橙 *C. sinensis* 种内品种的相似性距离系数为 0；柚 *C. grandis* 种内相似性距离系数为 0.656；宽皮桔 *C. reticulata* 种内相似性距离系数为 0.863。被田中认为是不同种的温州蜜柑 *C. unshiu*，蕉柑 *C. tankan*，沙柑 *C. nobilis* 等柑类生物型的相似性距离系数为零。

(二) 对部分未知起源的生物型的分析

被田中认为具有种的地位的香橙 *C. junos*，实际上是宜昌橙 *C. ichangensis* 和宽

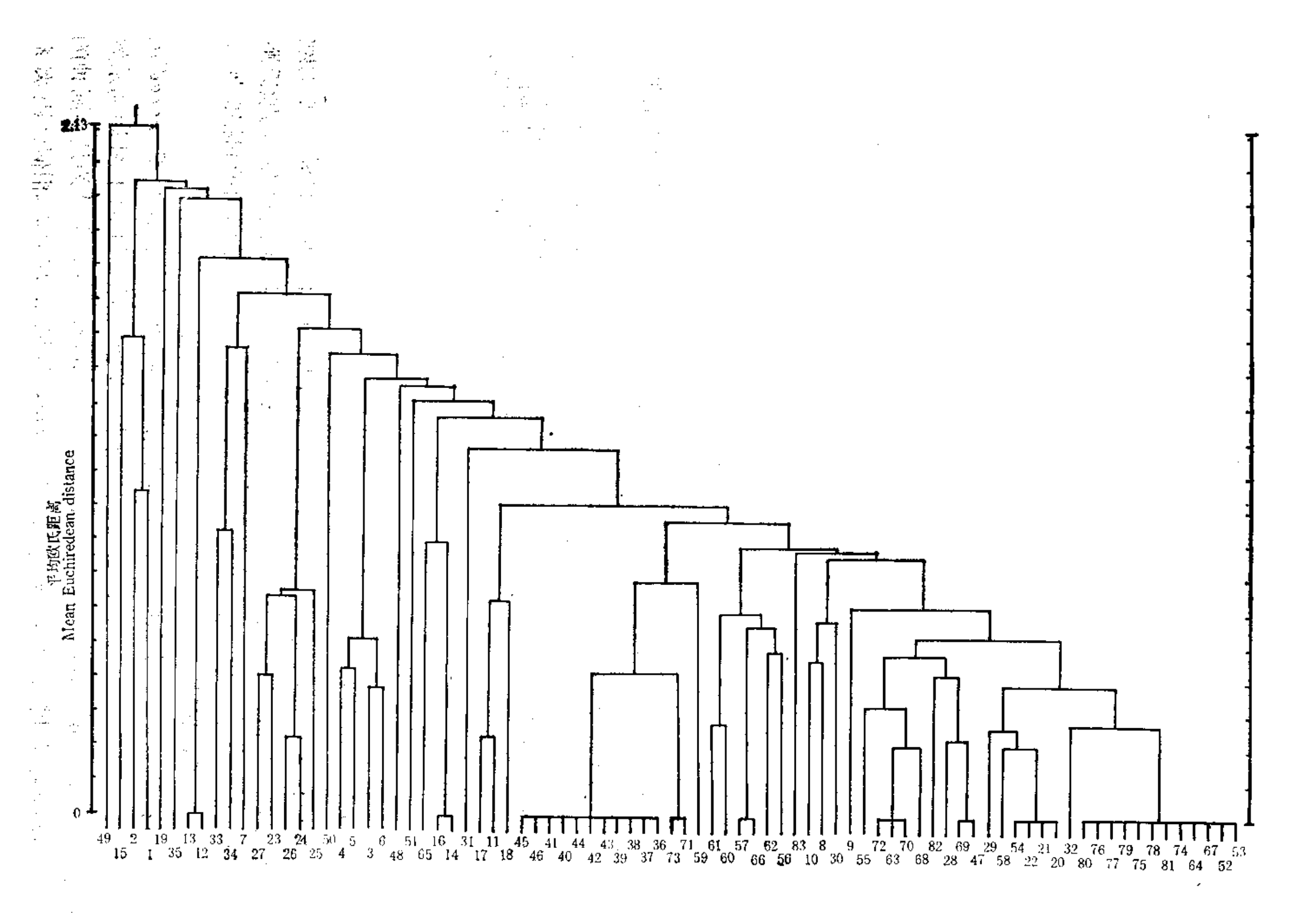


图 2 柑桔叶片蛋白质谱带相似性聚类分析树系图(样品中文名见附录)

Fig 2 The phenetic tree of cluster analysis constructed by the similarity of the protein patterns in citrus plant leaves (see the appendix for names of samples).

皮桔的杂种[16]。在叶片蛋白质相似性分析中，江北香橙以 0.273 的距离水平与温州蜜柑，沙柑等聚合在一起，这表明江北香橙有可能是普通香橙和宽皮桔的回交后代。形态学研究结果，江北香橙的很多性状比普通香橙更接近宽皮桔。香橙的另一生物型蟹橙，在聚类分析中却和宜昌橙更接近。

辛夫（Singh, 1967）和赖斯（Nath, 1969）认为，粗柠檬属于真正柠檬，而施科拉（Scora, 1969）通过叶片香精油分析，认为粗柠檬和真正柠檬无关[12]，后来又认为粗柠檬可能是枸橼和宽皮桔的杂种[13]。据本试验分析，粗柠檬在 0.612 的距离水平上与红桔、本地早等宽皮桔聚类，它与佛手及红檬檬的相似距离为 0.759，与真正柠檬的相似距离是 1.638。这一结果支持施科拉的观点，即粗柠檬可能是由枸橼 *C. medica* 或檬檬 *C. limonia* 与宽皮桔的杂种，而不是柠檬的杂种。

北京柠檬，巴柑檬和马柑柠檬在 0.630 的距离水平上聚为一类；西柠檬和金龙柠檬在聚类分析树系图上分别出现在枳附近。形态学研究认为，这些所谓的柠檬，都是柠檬的杂交种。然而，在聚类分析中，它们不与真正柠檬聚合在一起，其真正的亲本尚不能确定。

酸橙 *C. aurantium* 种内生物型蛋白质带型差异很大，小红橙、构头橙、代代及摩洛哥酸橙在聚类分析树系图中出现的位置很分散。一般认为，小红橙和构头橙可能都是酸橙和宽皮桔的杂种；代代是酸橙的变种；而摩洛哥酸橙则是真正的酸橙。起源不同，可能是酸橙生物型在聚类分析树系图上位置分散的主要原因。然而，摩洛哥酸橙与宽皮桔在聚类分析中显得关系很近，就蛋白质带型相似性来看，摩洛哥酸橙是否是真正的酸橙，还值得研究。

（三）演化趋势

蛋白质被称为第三级遗传语言（tertiary semantides），蛋白质谱带相似性的大小，在一定程度上反映了种类间遗传组成的差异和亲缘关系的远近[8,10,11]。

从叶片蛋白质谱带相似性聚类分析树系图（图 2）上可以发现，枳属 *Poncirus* 与柑亚组 Subsection Macroacrumen 的相似性距离系数为 1.842；柠檬 *C. limon* 与柑亚组是 1.638；大翼橙组 Section Papeda 与柑亚组是 1.523；柚组 Section Cephalocitrus 与柑亚组为 1.419；金柑属 *Fortunella* 与柑亚组是 1.273；橙组 Section Aurantium 与柑亚组是 0.863；桔亚组 Subsection Microacrumen 与柑亚组是 0.789。从枳到桔亚组，它们与柑亚组的相似性距离越来越小，显示出它们与柑亚类的亲缘关系愈来愈密切，柑亚类是进化的顶点。这种演化过程与田中的系统演化观点有类似之处，主要差别是金柑属及部分种类在演化中的位置。

四、讨　　论

1. 关于金柑属：

施文格 1915 年将金柑独立为一新属。在演化顺序上，田中将金柑属放在小花蜜柑亚区 Microacrumen 和四季桔亚区 Pseudofortunella 之间，Almen 试剂呈色反应研究认为应将它放在柑桔属起源点之后；而按叶片蛋白质谱带相似性，它却是介于柚和橙之间。

根据本试验分析，金柑四个种的蛋白质谱带很相似；种间相似性距离系数为 0.617，此柚品种间的相似性还大，柚品种间的相似性距离系数为 0.656。金柑属的种在形态上的差

别也很小，一般主要通过果实性状来区别，柚的品种也是这样。因此，从叶片可溶性蛋白质谱带相似性和外部形态差异考虑，如给予金柑属真正属的地位，则曾勉将柚独立为一属完全可以接受。

2. 柑桔属系统演化问题：

田中认为，柑桔属的来檬 *C. aurantifolia* 由大翼橙演化而来，来檬又衍生出枸橼和柚，柚再产生橙类。这一直线性的演化过程未考虑到宽皮桔，也很难说明柑桔属种类的复杂起源。

施科拉（Scora, 1975）研究提出，柑桔亚属 Subgenus *citrus* 有三个基本种（three basic species），即枸橼 *Citrus medica*、柚 *C. grandis* 和宽皮桔 *C. reticulata*，并认为柑桔亚属的其余种都是由这三个基本种衍生而来[13]。这种系统演化观点，突出体现了柑桔植物易杂交这一特点。

巴雷特和罗兹（Barret and Rhodes, 1976）对柑桔植物43个生物型，采用了143个植物学性状，进行了数量分类学研究，结果部分支持施科拉的观点，认为施科拉提出的三个基本种是真正的种（Good species）[9]。

本试验研究发现，按叶片可溶性蛋白质谱带相似性，柑桔属种类的演化过程为：柠檬→大翼橙→柚→橙→桔→柑。这里，大翼橙在演化顺序上与田中的看法有所不同，除此之外，这一演化趋势基本上是田中和施科拉系统演化观点的综合体现。

近来，美国学者根据一系列的化学和生理特征研究，提出柑桔有四个基本种，即除施科拉提出的三个种外，再加上新近发现的 *Citrus halimii*。然而，无论是三个基本种还是四个基本种，皆只局限于柑桔亚属中，而未涉及到大翼橙亚属 Subgenus *Papeda*，都还不能圆满地解释整个柑桔属种类间的关系。

3. 宜昌橙的分类地位：

宜昌橙在柑桔分类中的地位是有争议的。施文格按照翼叶大小、汁泡中酸油滴的有无等性状，把宜昌橙放在大翼橙亚属；田中特别强调花序的有无在分类中的作用，因而将不具花序的宜昌橙列入后生柑桔亚属的香橙亚区 Osmocitrus。柑桔花粉形态电镜观察研究表明，宜昌橙属于原始种，不应当划入后生柑桔亚属[2]。野外调查发现，宜昌橙的类型很多，有些翼叶大小超出身叶，有些具有退化的花序枝。这不仅证明宜昌橙与大翼橙叶片有共同之处，而且说明以花序有无来区分大翼橙和宜昌橙并非绝对。叶片蛋白质谱带相似性聚类分析结果表明，宜昌橙与大翼橙很接近，它首先与大翼橙类的马蜂柑 *Citrus hystrix* 聚合成群。因此，从各方面性状综合考虑，笔者认为，把宜昌橙作为亚热带起源的大翼橙归入大翼橙亚属，要显得更加合理。

附录（Appendix）：实验样品名录。本名按样品号、种名(中名)、田中系统学名(在此排斜体，其中施文格系统标有*)、凭证标本号顺序列出。其中只列出英文名者，是未知起源的生物型，暂未列系统学名。

1. 枳壳 *Poncirus trifoliata* Raf. *0012;
2. 飞龙枳 *P. trifoliata* var. *mostrosa* Swing. *0083;
3. 罗浮 *Fortunella margarita* Swing. *0149;
4. 罗纹 *F. japonica* Swing. *0610;
5. 金豆 *F. hindsii* var. *chintou* Swing. *1711;

6. 金弹 *F. crassifolia* Swing. 0133;
7. 马蜂柑 *Citrus hystrix* D. C. *0185;
8. 佛手 *C. medica* var. *sarcodactylis* Swing. *0033;
9. 粗柠檬 *C. jambhiri* Lush. 0106;
10. 红檬檬 *C. limonia* Osbeck 0048;
11. 巴柑檬 *C. bergamia* Risso. 0418;
12. 尤力克 *C. limon* cv. *Eureka* *0612;
13. 里斯本 *C. limon* cv. *Lisbon* *0067;
14. 科塞来檬 Kusaie lime 0029;
15. 西柠檬 West lemon 0314;
16. 土柠檬 Tu lemon 0041;
17. 马柑柠檬 Magan lemon 0915;
18. 北京柠檬 Meyer lemon 0718;
19. 金龙柠檬 Golden-dragon lemon 0077;
20. 马叙 *C. paradisi* cv. *Marsh* *0021;
21. 邓肯 *C. paradisi* cv. *Duncan* *0024;
22. 汤普森 *C. paradisi* cv. *Thompson* *0034;
23. 沙田柚 *C. grandis* cv. *Shatian* *0042;
24. 垫江柚 *C. grandis* cv. *Dianjian* *0094;
25. 四季抛 *C. grandis* cv. *Shiki* *0014;
26. 晚白柚 *C. grandis* cv. *Banpei* *0261;
27. 文旦柚 *C. grandis* cv. *Buntan* *0244;
28. 三宝柑 *C. sulcata* Hort. ex Takahashi 1147;
29. 夔柑 Kui-gan 0223;
30. 香圆 *C. wilsonii* Tanaka 0026;
31. 真橙 *C. junos* cv. *Tsengchan* 0028;
32. 江北香橙 *C. junos* cv. *Jiangbei* Shangcheng 0037;
33. 蟹橙 *C. junos* cv. *Xaicheng* 0087;
34. 紫花宜昌橙 *C. ichangensis* Swing. *0174;
35. 白花宜昌橙 *C. ichangensis* Swing. *0242;
36. 锦橙 *C. sinensis* cv. *Glorious* *1516;
37. 先锋橙 *C. sinensis* cv. *Vanguard* 1631;
38. 柳橙 *C. sinensis* cv. *Lauchan* 0632;
39. 暗柳橙 *C. sinensis* cv *Anlauchan* 0625;
40. 血橙 *C. sinensis* cv. *Blood* 1315;
41. 伏令夏橙 *C. sinensis* cv. *Valencia* 1233;
42. 新会橙 *C. sinensis* cv. *Sinhui* 0513;
43. 桃叶橙 *C. sinensis* cv. *Amygdalifolia* 0071;
44. 改良橙 *C. sinensis* cv. *Gailiang* 0624;
45. 汤姆逊甜橙 *C. sinensis* cv. *Thomson* 0817;
46. 华盛顿脐橙 *C. sinensis* cv. *Washington* 1010;
47. 摩洛哥酸橙 *C. aurantium* L. *0095;
48. 日本夏橙 *C. natsudaidai* Hayata 1230;
49. 小红橙 Chu Luang 0058;
50. 构头橙 Gou-tou Cheng 0043;
51. 代代 Daidai 0076;
52. 蕉柑 *C. tankan* Tanaka 1145;
53. 沙柑 *C. nobilis* Lour. 1643;
54. 大叶南丰蜜桔 *C. kinokuni* cv. *Large* leaf Nanfen 0332;

55. 小叶南丰蜜桔 *C. kinokuni* cv. *Small* leaf Nanfen 0237;
56. 莳桔 *C. kinokuni* cv. *Shih* Chieh 0128;
57. 早桔 *C. kinokuni* cv. *Tsao* Chieh 1527;
58. 本地早 *C. succosa* Hort. ex Tanaka 0425;
59. 椪柑 *C. reticulata* Blanco *0448;
60. 大红袍 *C. tangerina* cv. *Dahongpao* 0075;
61. 福桔 *C. tangerina* cv. *Fuju* 0818;
62. 江南柑 *C. tangerina* cv. *Jiangnangan* 0919;
63. 红桔 *C. tangerina* Hort. ex Tanaka 0714;
64. 硬芦 *C. reticulata* cv. *Yinlu* 0534;
65. 汕头山桔 *C. sunki* Hort. ex Tanaka 1120;
66. 年桔 Timkat 0925;
67. 茶枝柑 Chatsukan 0723;
68. 槾桔 *C. tardifrex* Hort. ex Tanaka 0438;
69. 朱桔 *C. erythrosa* Hort. ex Tanaka 0118;
70. 土桔 *C. reticulata* cv. *Tuchu* 0044;
71. 克里曼丁 Clementine 0834;
72. 十月桔 *C. reticulata* cv. *Shiyue* 1114;
73. 瓯柑 *C. suarissima* Tanaka 1436;
74. 四会柑 *C. suhuiensis* Hort. ex Tanaka 1416;
75. 宫川 *C. unshiu* cv. *Miyacawa* 1421;
76. 兴津 *C. unshiu* cv. *Okitsu* 1122;
77. 龟井 *C. unshiu* cv. *Kamei* 0317;
78. 尾张 *C. unshiu* cv. *Owari* 0023;
79. 米泽 *C. unshiu* cv. *Yonezawa* 1215;
80. 南柑 20 号 *C. unshiu* cv *Nankan* No. 20 1318;
81. 本地广桔 *C. reticulata* cv. *Pentikanchu* 1346;
82. 枳橙 *C. trifoliata*×*C. sinensis* 0064;
83. 枳柚 *C. trifoliata*×*C. grandis* 0419。

参 考 文 献

[1] 井上数賴,1982: 最新園芸大辞典, Vol. 6, 誠文堂新光社。
[2] 叶荫民等,1982: 柑桔花粉形态的研究,中国农业科学,(5): 62—66。
[3] 张龙翔等,1981: 生化实验技术和方法,高等教育出版社。
[4] 贺善文,1979: 柑桔类种质资源中心问题的初步探讨,园艺学报, **1979**(6): 19—24。
[5] 徐克学,1982: 浅谈分类学的数学方法,植物分类学报,**20**(4): 502—508。
[6] 徐克学等,1982: 科学的分类方法——数量分类学,生物科学参考资料,第十七集,16—26。
[7] 曾 勉,1960: 对柑桔分类的认识体会和整理意见,中国果树, **1960**(2): 31—37。
[8] A. Light 著,胡昌序译,1980: 植物化学分类学,科学出版社。
[9] Barrett, H. C. & A. M. Rhodes, 1976: A numerical taxonomic study of affinity relationship in cultiveted citrus and its close relatives, *Syst. Bot.* **1**(2): 105—136.
[10] Boulter, D., D. A. Thurman & B. L. Turner, 1966: The use of disc electrophoresis of plant proteins in systematics, *Taxon* (15): 135—142.
[11] Johnson, B. L. 1972: Seed protein profiles and the origin of the hexaploid wheats, *Amer. J. Bot.* **59**(9): 952—960.
[12] Scora, R. M. et al. 1969: Taxonomic affinities within the rough lemon group as aided by gaschromatography of their essential oils, *Pro. First Int. Citrus Symp.* **1**: 441—450.
[13] Scora, R. M., 1975: On the histry and origin of Citrus, *Bull. Tor. Bot. Club,* **102**(6): 369—375.
[14] Singh, R. & N. Nath, 1969: Practidal approach to the classification of citrus, *Pro. First Int. Citrus Symp.* **1**: 435—440.
[15] Sneath, P. H. A. & R. R. Sokal, 1973: Numerical Taxonomy, Printed in the United States of America.

[16] Swingle, T. W. et al., 1967: The citrus industry, Vol. 1, second edition, University of California Press.

NUMERICAL CHEMOTAXONOMICAL STUDY ON *CITRUS* PLANTS CULTIVATED IN CHINA

ZHU LI-WU

(*Department of Horticulture, Anhui Agricultural College, Hefei, China*)

Abstract Soluble proteins were extracted from mature leaves of 83 citrus biotypes. Their protein patterns were obtained by acrylamide gel electrophoresis. The similarity of the protein patterns among the samples was calculated by computer according to the principle and methods of numerical taxonomy.

The similarity comparison was made between different species and varieties included in the Swingl's system. The distance coefficients of similarity (DCS) is 2.13 between species in the genus *Citrus*, 0.927 in *Poncirus* and 0.617 among *Fortunella species*. The DCS of biotypes in *Citrus limon*, *C. paradisi* and *C. sinensis* are zero, and those in *C. grandis* and *C. reticulata* are 0.656 and 0.863 respectively. There is no difference among satsuma mandarin, Tankan and King mandarin, which are considered respectively as a good species in Tanaka's system.

Ancestors of some biotypes, whose origin was unknown berore, are postulated in this work. Jiang Bai Shang Cheng is probably a hybrid between *C. junos* Tanaka and mandarin; rough lemon may be a hybrid of mandarin with citron or lime, but not with lemon. Some so-called lemon biotypes are not in the same cluster as true lemon (Eureka or Lishon). The biotypes of sour orange, all of which are scattered in the phenetic tree of cluster analysis (PTCA), might have been derived from different ancestors.

In the PTCA the evolutionary tendency from *Poncirus* to Macroacrumen in the citrus plants may be found on the basis of the DCS of different genera, sections and subsections respectively with the subsection Macroacrumen.

The present author considers that if *Fortunella* is recognized as true genus, *Cephalocitrus* should also be an acceptable genus. The position of *Fortunella* in the PTCA is between the sections Cephalocitrus and Aurantium, but it does not represent its position in the phylogeny. Taking comprehensive data into consideration it appear to be more reasonable to place *C. ichangensis*, as member of *Papeda* originated in the subtropics, in the section *Papeda*.

Key words *Citus*; Protein; Electrophoresis; Similarity of the patterns; Cluster analysis.